



## QUALIDADE DO DNA EXTRAÍDO A PARTIR DE AMOSTRAS DE SALIVA COLHIDAS COM O KIT ORAGENE®

**NUNES, Ana Paula<sup>1</sup>; OLIVEIRA, Isabel Oliveira de<sup>2</sup>; Millech, Cristine<sup>3</sup>; Santos, Betânia Rodrigues dos<sup>3</sup>; Silva, Liziane Pereira<sup>3</sup>; Araújo, Cora Luiza<sup>4</sup>; González, David A<sup>4</sup>; Madruga, Samanta W<sup>4</sup>; Noal, Ricardo Bica<sup>4</sup>; Dumith, Samuel de C.<sup>4</sup>; Mendonça, Fernanda dos S.I.<sup>4</sup>; Menezes, Ana Maria Baptista<sup>4,5</sup>**

<sup>1</sup>Bolsista PRODOC-CAPES do Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia, FACMED/UFPel;

<sup>2</sup> Departamento de Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Biologia-IB/UFPel;

<sup>3</sup> Acadêmica de Ciências Biológicas-UFPel;

<sup>4</sup> Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia-FACMED/UFPel

<sup>5</sup> Orientadora

### 1. INTRODUÇÃO

Estudos do ciclo vital permitem avaliar efeitos a longo prazo de diferentes exposições sobre a saúde ou sobre o risco de doenças durante as várias fases da vida dos indivíduos, como na gestação, infância, adolescência, na fase adulta e no idoso. Neste sentido, os estudos de coortes de nascimentos são essenciais para investigar determinantes precoces da morbidade e do estado nutricional de adultos. Existem grandes estudos de coortes realizados em diferentes países, como o de ALSPAC (Ness, 2004) e o Millenium Cohort Study (Smith *et al.*, 2002), ambos no Reino Unido; The Cebu Study (Team, 1991) nas Filipinas; The National Children's Study, nos EUA (Landrigan *et al.*, 2006) e Birth to Twenty na África do Sul (Richter *et al.*, 2007).

O Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia, do Departamento de Medicina Social da Faculdade de Medicina da UFPel possui três estudos de coorte de nascimentos: a coorte de 1982, a coorte de 1993 e a coorte de 2004. Nesses estudos todos os nascimentos ocorridos na cidade de Pelotas, RS-Brasil, nos respectivos anos, foram monitorados e as mães foram entrevistadas nas maternidades, sendo coletadas informações de caráter demográfico, biológico e sócio-econômico. Desde o nascimento, os participantes das coortes têm sido acompanhados em diferentes momentos de suas vidas.

A coorte de 1993 estava composta inicialmente por 5.304 nascimentos ocorridos na zona urbana de Pelotas (Tomasi *et al.*, 1996). Os indivíduos foram

acompanhados com 1, 3, 6 e 12 meses; 4 e 11 anos e, mais recentemente, em 2008, com 14 e 15 anos. Neste último acompanhamento, amostras biológicas de saliva, alternativa não invasiva, foram coletadas com o kit Oragene®, para extração de DNA. Segundo o fabricante, o material colhido pode ser armazenado à temperatura ambiente por período indeterminado até que seja realizado a extração de DNA.

Considerando a amostra de saliva colhida de cada indivíduos da coorte 1993 foi processada para a extração de DNA em dois momentos distintos, com intervalo de 8 meses entre a primeira e a segunda, o objetivo do presente trabalho foi comparar a quantidade e a qualidade do DNA obtido das extrações de saliva, no que se refere ao rendimento ( $\mu\text{g}$ ) e à relação entre as absorvâncias 260/280nm (RAT) (tabela 1) respectivamente.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Entre janeiro e agosto de 2008 foi realizada a coleta de saliva dos adolescentes pertencentes ao Estudo de Coorte de nascidos vivos em 1993, da cidade de Pelotas-RS-Brasil, usando o kit Oragene®. Os adolescentes foram orientados a permanecer sem ingerir alimentos, bebidas, balas, chicletes ou qualquer outra substância que removesse células da mucosa oral, pelo menos 30 minutos antes da coleta de amostra. Após a coleta, as amostras saliva/Oragene foram mantidas à temperatura ambiente até o momento de seu processamento. Realizaram-se duas extrações independentes de DNA, com intervalo de oito meses entre as mesmas.

Na primeira extração, foi padronizado o uso de 2mL da solução saliva/Oragene e, na segunda, o volume restante desta solução contido no recipiente de coleta. Em ambos os procedimentos, foi seguido o protocolo de extração e purificação recomendado pelo fabricante.

Nas duas extrações, o controle de qualidade foi verificado em 20% da amostras, onde foi realizada a leitura em espectrofotômetro (BioPhotometer, Eppendorf) com diluição de 5:95. Após a leitura, as concentrações foram ajustadas  $[(A_{260}-A_{320}) \times 20 \times 50]$ , bem como a relação entre as leituras das absorvâncias  $[RAT = (A_{260}-A_{320}) / (A_{280}-A_{320})]$ , conforme sugerido pelo fabricante do Kit.

A partir do programa estatístico STATA10.0 foi realizada a análise de Bland-Altman visando verificar a repetibilidade dos dados entre as leituras do controle de qualidade do DNA extraído nos dois momentos.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos na primeira extração foram 91,67 $\mu\text{g}$  para rendimento e 1,78 para RAT; já no segundo processamento, obteve-se 79,16 $\mu\text{g}$  e 1,84 para esses mesmos indicadores. A comparabilidade entre as variáveis que foram analisadas quanto à qualidade do DNA obtido nas duas extrações é apresentado na tabela 1.

**Tabela 1.** Comparação entre indicadores de qualidade do DNA obtido através de duas extrações a partir de saliva colhida com kit Oragene®, em indivíduos pertencentes à coorte de nascidos em 1993, Pelotas-RS, (N= 813)

	Limites de concordância	Diferença Média (CI 95%)	Varição	P entre variâncias
Rendimento (µg)	-108.838 - 84.052	-12.393 (-15.713; -9.074)	7.400 - 395.000	0.000
Concentração(µg/µL)	-0.234 - 0.412	0.089 (0.078; 0.100)	0.039 - 1.514	0.001
RAT A260/A280	-0.141 - 0.274	0.067 (0.060; 0.074)	1.355 - 2.430	0.001

Como pode ser observada, houve uma diferença média no rendimento entre as extrações no valor de -12,4µg, com  $P < 0,001$ . Na RAT, a diferença média encontrada foi de 0,067 (IC95% 0,06;0,07) com  $P < 0,001$ .

Tomando por base uma relação mínima de 1,6 (A260/A280), procedeu-se a análise comparativa entre as duas extrações quanto às amostras que não alcançaram este valor de RAT (tabela 2).

**Tabela 2.** Valores de RAT (A260/A280) obtidos em leitura por espectrofotômetro entre duas extrações a partir de saliva colhida com kit Oragene®, em indivíduos pertencentes à coorte de nascidos em 1993, Pelotas-RS (N= 813)

	N.de amostras com RAT <1,6	Média (DP)	Varição
Extração 1	45	1,50 (0,12)	0,84 - 1,59
Extração 2	6	1,53 (0,05)	1,44 – 1,59

Conforme observado, o rendimento obtido na segunda extração foi menor que o obtido na primeira, entretanto, a qualidade do DNA extraído, medido pela RAT, foi superior.

O *kit Oragene®* para obtenção de DNA baseia-se num método não invasivo, simples, de fácil coleta, tornando-se alternativo à extração a partir de sangue periférico, que requer profissional especializado para a coleta (Rylander-Rudqvist *et al.*, 2006) e uso de material perfuro-cortante (King *et al.*, 2002; London *et al.*, 2001). Outra importante vantagem do *kit* é a utilização de um purificador químico que preserva a integridade celular, e evita a degradação do material genômico e a contaminação bacteriana (Rylander-Rudqvist *et al.*, 2006). De acordo com as indicações do *kit Oragene®*, os frascos de coleta contendo a saliva, podem ficar estocados em temperatura ambiente por até um ano, sem que o DNA sofra degradação. Entretanto, em estudo que avaliou as diferenças na qualidade e quantidade do material extraído, com diferentes períodos de intervalos entre a coleta e a extração, foi demonstrado que há uma redução no sucesso da extração, proporcional ao período de estocagem do material coletado (Feigelson *et al.*, 2001), o que no presente estudo não foi demonstrado com o kit comercial utilizado.

A grande maioria das extrações realizadas em ambos procedimento tiveram a RAT na faixa recomendada em protocolos de extração de DNA (Sambrook, Fritsch & Maniatis, 1989). Entretanto a concentração do DNA obtido nesse estudo está abaixo do valor médio esperado indicado pelo fabricante. Os prováveis fatores que podem ter contribuído para esse achado foram: a realização de um bochecho com água antes da coleta, que pode ter ocasionado lavagem da mucosa, diminuindo o número de células presentes na saliva; e a presença de restos alimentares e/ou pigmentos observados em algumas salivas coletadas, apesar das recomendações feitas

previamente aos doadores. Por outro lado, existe escassa literatura científica relatando o rendimento obtido com o uso do *kit Oragene®* para extração de DNA.

Provavelmente a diminuição do rendimento na segunda extração de DNA, realizada oito meses após a primeira, seja decorrente de uma menor estabilidade das moléculas do DNA ao longo do armazenamento à temperatura ambiente, a qual deveria ter sido mantida pelo reagente de extração fornecido pelo kit. Por outro lado, frente a esta menor concentração de DNA, o reagente de purificação garantiu uma melhor qualidade do DNA extraído, fato comprovado pela RAT.

#### 4) CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, concluímos que amostras de DNA extraídas com o *kit Oragene®* com intervalo de oito meses apresentam qualidade e quantidade satisfatórias para futuros estudos genéticos.

#### 5) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

FEIGELSON, H. S., RODRIGUEZ, C., ROBERTSON, A. S., JACOBS, E. J., CALLE, E. E., REID, Y. A., THUN, M. J. Determinants of DNA yield and quality from buccal cell samples collected with mouthwash. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, 2001, v.10, p.1005 – 8.

KING, I. B., SATIA-ABOUTA, J., THORNQUIST, M. D., BIGLER, J., PATTERSON, R. E., KRISTAL, A. R., SHATTUCK, A. L., POTTER, J. D., WHITE, E. Buccal cell DNA yield, quality, and collection costs: comparison of methods for large-scale studies. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, 2002, v.11, p.1130 – 3.

LANDRIGAN, P.J., TRASANDE, L., THORPE, L.E., GWYNN, C., LIOY, P.J., D'ALTON, M.E., LIPKIND, H.S., SWANSON, J., WADHWA, P.D., CLARK, E.B., RAUTH, V.A., PERERA, F.P., SUSSER, E. The Nacional Children's Study: A 21-year prospective Study of 100000 American Children. **Pediatrics**, 2006, v.118, n.5, p.2173-2186.

LONDON, S. J., XIA, J., LEHMAN, T. A., YANG, J. H., GRANADA, E., CHUNHONG, L., DUBEAU, L., LI, T., GLORIA L. DAVID-BEABES, G. L., LI, Y. Collection of buccal cell DNA in seventhgrade children using water and a toothbrush. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, 2001, v.10, p.1227–30.

NESS, A. R. The Avon Longitudinal Study of Parents and Children (ALSPAC) – a resource for the study of the environmental determinants of childhood obesity **European Journal of Endocrinology**, 2004, v.151, p. U141–U149.

RICHTER, L., NORRIS, S., PETTIFOR, J., YACH, D., CAMERON, N. Cohort Profile: Mandela's Children: The 1990 birth to twenty study in South Africa. **International J of Epidemiology**, 2007, v.36, p.504-511.

RYLANDER-RUDQVIST, T., HA'KANSSON, N., TYBRING, G., WOLK, A. Quality and Quantity of Saliva DNA Obtained from the Self-administrated Oragene Method—

A Pilot Study on the Cohort of Swedish Men. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, 2006, v.15, n.9, p.1742-1745.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.

SMITH K., JOSHI, H. The Millennium Cohort Study. **Popul Trends**. 2002; v.107, p30-34.

THE CEBU STUDY TEAM. Underlying and proximate determinants of child health: the Cebu Longitudinal Health and Nutrition Study. **Am. J. Epidemiol**, 1991, v.133, p.185-201.

TOMASI, E., BARROS, C. F., VICTORA, C. G. As mães e suas gestações: comparação de duas coortes de base populacional no Sul do Brasil. **Cad. Saúde Públ**, 1996, v.12, supl.1, p.21-25.

Apoio: CAPES, Wellcome Trust Foundation, CNPq